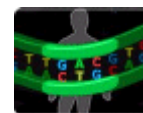




## SIF - FARMACOGENETICA



### Newsletter Numero 75 – Luglio 2015

---

Attenzione: le informazioni riportate hanno solo un fine illustrativo  
e non sono riferibili né a prescrizioni né a consigli medici

---

## Sommario

### ⇒ Oncologia

- Validità clinica del test farmacogenetico basato sul genotipo DPYD nella predizione della tossicità da fluoropirimidine
- Analisi genomica integrata dei gliomi diffusi di basso grado
- Il profilo di espressione dei microRNA predice l'*outcome* clinico alla terapia basata su carboplatino/paclitaxel nel melanoma metastatico (trial ECOG-ACRIN E2603)
- Associazione dei polimorfismi su IL-8 ed eNOS con l'esito clinico di pazienti affette da tumore alla mammella in trattamento con bevacizumab: un'analisi esplorativa

### ⇒ Neurologia

- Il polimorfismo COMT Val158Met non è associato alla risposta clinica a lungo termine nel disturbo ossessivo-compulsivo nella popolazione giapponese

### ⇒ Cardiovascolare

- I geni TET2 e CSMD1 modulano la risposta alla terapia con idroclorotiazide in pazienti naïve affetti da ipertensione essenziale
- I polimorfismi nel gene URAT1 influenzano l'effetto uricosurico del losartan nei pazienti ipertesi con iperuricemia
- Regolazione dell'espressione della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo da parte di polimorfismi "upstream": ridotta espressione associata a rs247616

### ⇒ Immunomodulazione

- Correlazione tra il microRNA-186 plasmatico e proteinuria nella glomerulosclerosi focale segmentale
- Uno studio di farmacogenetica implica SLC9A9 nell'attività di malattia nella sclerosi multipla

### ⇒ La metanalisi del mese

- Associazione tra i polimorfismi a singolo nucleotide del gene XRCC3 e gli eventi avversi indotti da radioterapia sul tessuto normale: una meta-analisi

## ONCOLOGIA

### VALIDITÀ CLINICA DEL TEST FARMACOGENETICO BASATO SUL GENOTIPO DPYD NELLA PREDIZIONE DELLA TOSSICITÀ DA FLUOROPIRIMIDINE

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Le fluoropirimidine (FL) sono antiblastici largamente utilizzati nella terapia dei tumori solidi. Tali farmaci sono molto efficaci, tuttavia, esiste una grande variabilità di risposta dei pazienti trattati sia in termini di efficacia sia di tossicità.

Recentemente, due gruppi di lavoro indipendenti (*the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)* e *the Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy (DPWG)*) hanno pubblicato linee guida specifiche sulla genotipizzazione del paziente in terapia con FL. Tali linee guida identificano tre varianti polimorfiche (gli SNP rs3918290, rs55886062 e DPYD-rs67376798) del gene diidropirimidina deidrogenasi (DPYD) come fattori altamente predittivi di tossicità correlata alla chemioterapia a base di FL. In particolare, le indicazioni CPIC raccomandano di scegliere una terapia alternativa alle fluoropirimidine nei portatori di due varianti (eterozigoti composti o omozigoti) e di adottare una riduzione del 50% del dosaggio per i portatori di un'unica variante (eterozigoti) per ciascuno di questi SNP.

Lo scopo principale di questo studio è stato validare la specificità dei tre polimorfismi DPYD summenzionati nel predire l'evenienza di tossicità di grado severo in un campione molto ampio di pazienti trattati con FL. Obiettivo secondario è stato analizzare la possibile influenza nella predizione di tossicità da FL di altre varianti non ancora inserite nelle linee guida CPIC.

Sono stati selezionati 603 pazienti con diagnosi di tumore solido (confermata con esame istologico) provenienti da una coorte di ben 5126 casi clinici arruolati presso il *Centro di Riferimento oncologico (CRO)-National Cancer Institute di Aviano, Italia*. I soggetti inclusi nello studio erano tutti Caucasic e avevano eseguito almeno tre cicli di chemioterapia a base di FL senza interruzioni da fenomeni di tossicità associati al trattamento. Il DNA genomico è stato estratto mediante un kit commerciale (*QIAamp DNA Blood Mini kit*; Qiagen, Mississauga, ON, Canada) e la genotipizzazione degli SNP DPYD- rs67376798, -rs17376848 e -rs1801160 è stata eseguita mediante *TaqMan SNP genotyping assays* (AB Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); l'SNP DPYD-rs3918290 è stato analizzato attraverso pirosequenziamento con il sistema *PSQ96MA system* (Qiagen) e i polimorfismi DPYD-rs55886062, -rs1801158, -rs1801159, e -rs2297595 sono stati identificati mediante sequenziamento con metodo di Sanger su piattaforma *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

I polimorfismi DPYD-rs3918290 e -rs67376798 erano associati a una tossicità di grado  $\geq 3$ . L'SNP DPYD-rs55886062 non è stato riconosciuto predittivo di tossicità, probabilmente a causa della sua bassa frequenza allelica. Tuttavia, gli autori hanno purtroppo dovuto registrare la morte di uno dei due pazienti portatori di tale variante (un eterozigote composto con DPYD-rs3918290) avvenuta dopo un solo ciclo di chemioterapia. È importante sottolineare che all'interno di un gruppo di 7 individui portatori di una variante tra DPYD-rs3918290, -rs55886062 e -rs67376798, che non avevano sviluppato tossicità di grado  $\geq 3$ , il 57% ha richiesto una modifica del regime posologico a causa di tossicità moderata cronica. Infine, nessuna altra variante analizzata ha mostrato un'associazione significativa con la tossicità da FL.

Prima di questo lavoro, un numero rilevante di studi aveva messo in luce il ruolo svolto dai polimorfismi del gene DPYD nell'insorgenza di fenomeni tossici di grado severo, ciononostante, il test farmacogenetico per predire la tossicità da FL non è ancora entrato nella pratica clinica.

Le ragioni sono da ricercare nella bassa frequenza degli alleli polimorfici DPYD nella popolazione generale, ma dipendono anche dal fatto che le varianti da analizzare non sono state ancora ben definite così come la sensibilità e la specificità dei test farmacogenetici oggi disponibili.

Gli autori di questo studio, in accordo con i risultati di altri ricercatori, hanno trovato una forte associazione tra gli SNP DPYD-rs3918290 o -rs67376798 con i fenomeni di tossicità di grado  $\geq 3$  nei pazienti trattati con

FL. La prevalenza di tali varianti insieme a quella dell'SNP DPYD-rs55886062 è molto bassa nella popolazione Caucasica, ma l'impatto clinico della genotipizzazione di tali varianti è molto significativo. Infatti, l'SNP DPYD-rs55886062 è stato identificato in eterozigosi in soli 2 pazienti, ma uno di questi, eterozigote composto con la variante DPYD-rs3918290, è morto a causa di tossicità severa, l'altro paziente ha sviluppato una tossicità di grado 2 che ha richiesto un ritardo nella somministrazione e una riduzione delle dosi di FL.

Sulla base della determinazione del PPV (*Positive Predictive Value*), la variante DPYD-rs3918290 è risultata essere la più predittiva di tossicità da FL con un PPV del 67% confrontato a un valore del 61% relativo al PPV di tutti e 3 i polimorfismi considerati insieme.

Rispetto a ricerche analoghe condotte in precedenza, un punto di forza di questo studio, oltre alla numerosità del campione, è che i pazienti che avevano subito fenomeni di tossicità da FL non erano stati mai esposti a tale classe di chemioterapico e questo ha permesso di evitare un bias dovuto a eventuale tossicità cumulativa.

I polimorfismi DPYD-rs3918290, -rs67376798 e -rs55886062 sono altamente predittivi di tossicità di grado severo associata alla chemioterapia a base di fluoropirimidine. Il test farmacogenetico per l'identificazione di tali varianti dovrebbe essere incluso nella pratica clinica per predire fenomeni di tossicità, consentire eventuali aggiustamenti del regime posologico o la scelta di opzioni chemioterapiche alternative.

**Parole chiave:** fluoropirimidine, polimorfismo, tossicità, diidropirimidina deidrogenasi, cancro, chemioterapia, farmacogenetica.

#### Riferimento bibliografico

[Toffoli G](#) et al. *Int J Cancer* 2015 Jun 23 [Epub ahead of print].

## ANALISI GENOMICA INTEGRATA DEI GLIOMI DIFFUSI DI BASSO GRADO

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

I gliomi di basso e medio grado sono neoplasie infiltrative che si sviluppano in particolare negli emisferi cerebrali degli adulti e includono astrocitomi, oligodendrogliomi ed oligoastrocitomi. Data la loro natura invasiva, una resezione chirurgica completa non è possibile e la presenza di residui tumorali porta a ricadute e progressione maligna. Alcuni gliomi progrediscono a glioblastoma in pochi mesi, mentre altri rimangono stabili per anni. Allo stesso modo, la sopravvivenza varia da 1 a 15 anni, ed alcuni gliomi di basso grado presentano un'alta sensibilità terapeutica (Macdonald D et al. *Ann Neurol* 1990,27:573-4; van den Bent MJ *Neuro Oncol* 2014,16: 1570-4; van den Bent MJ et al. *J Clin Oncol* 2013,31:344-50). Il trattamento varia a seconda dell'estensione della resezione, dell'istotipo, del grado e di altri test, ed include il monitoraggio clinico, la chemioterapia e la radioterapia (Bourne TD, Schiff D. *Nat Rev Neurol* 2010,6:695-701; Sanai N et al. *J Neurosurg* 2011,115:948-65; Jakola AS et al. *JAMA* 2012,308:1881-8). La classificazione dei gliomi di basso grado presenta una grande variabilità intra e inter-osservatore e non predice adeguatamente l'*outcome* clinico, per cui aumenta il ricorso dei clinici ad una classificazione genetica per guidare la decisione della gestione di questi pazienti. Mutazioni nei geni *IDH1* e *IDH2* caratterizzano la maggior parte dei gliomi di basso grado negli adulti, e definiscono un sottotipo a prognosi favorevole (Jiao Y et al. *Oncotarget* 2012,3:709- 22; Parsons DW et al. *Science* 2008,321:1807-12; Yan H et al. *N Engl J Med* 2009,360:765-73). I gliomi che presentano una mutazione dell'*IDH* e una codelezione 1p/19q caratteristica degli oligodendrogliomi, presentano una risposta migliore alla radio-chemioterapia e sono associati con una sopravvivenza più lunga rispetto ai gliomi senza queste alterazioni (Cairncross G et al. *J Clin Oncol* 2013,31:337-43).

È stata condotta un'analisi integrata di gliomi di basso grado di pazienti adulti per identificare classi biologiche con comportamento clinicamente distinto e per determinare se queste classi potessero essere meglio definite dallo status molecolare piuttosto che dalla classe istologica.

Sono stati analizzati campioni tumorali di 293 adulti con gliomi di basso grado non trattato, di cui 100 astrocitomi, 77 oligoastrocitomi e 116 oligodendrogliomi. Sono stati esclusi i tumori pediatrici, poiché caratterizzati da una patogenesi molecolare diversa.

Per confrontare i risultati dell'analisi molecolare con la classificazione istologica e quella basata su mutazione *IDH* e codelezione 1p/19q, i gliomi di basso grado sono stati classificati in tre categorie: gliomi con mutazioni *IDH* e codelezione, gliomi con mutazione *IDH* e senza codelezione e gliomi *wild-type* per la mutazione *IDH*. È stata riscontrata una forte associazione tra la presenza di mutazione *IDH* e codelezione e la classe istologica oligodendrogliomi (69/84 campioni). I campioni con una mutazione *IDH* e senza codelezione (139 campioni) erano rappresentati in particolare da astrocitomi e oligoastrocitomi, mentre i campioni *wild-type* erano per lo più rappresentati da astrocitomi (31/55) e gliomi di grado III (42/55). Per determinare se i profili molecolari potessero consentire di individuare sottotipi di gliomi con diverse caratteristiche biologiche, sono stati individuati cluster in base a metilazione del DNA (5 cluster), espressione genica (4 cluster), DNA *copy number* (3 cluster) ed espressione di microRNA (4 cluster). Per integrare questi dati ed effettuare confronti con le classi istologiche ed i sottotipi *IDH*/codelezione, sono stati definiti tre cluster con distinte caratteristiche biologiche. Lo status *IDH*/codelezione presentava una maggiore concordanza con l'assegnazione ai cluster rispetto alle classi istologiche, indicando che lo status mutazionale consente una migliore definizione delle caratteristiche biologiche dei gliomi di basso grado rispetto alle classi istologiche. Sono state riscontrate 9.885 mutazioni in 289 campioni (29 mutazioni per campione in media). I campioni dei gliomi di basso grado *wild-type* presentavano più mutazioni rispetto ai campioni con mutazioni *IDH* con o senza codelezione ( $p < 0.001$ ). Mutazioni nei geni *CIC* e *FUBP1* sono state riscontrate rispettivamente nel 62% e nel 29% dei gliomi con mutazioni *IDH* e codelezione, ma non negli altri sottotipi. Nello stesso sottotipo sono state osservate mutazioni nei geni *PIK3CA* (20%), *PIK3R1* (9%) e *NOTCH1* (31%), come anche nuove mutazioni in *ZBTB20* (9%) e *ARID1A* (6%). Inoltre, il 96% dei portatori di una mutazione *IDH* e della codelezione presentava una mutazione attivante nel promotore del gene *TERT*, portando ad una elevata espressione. Il 94% dei gliomi di basso grado con mutazione *IDH* e senza codelezione presentavano una mutazione del *TP53*. Alterazioni inattivanti del gene *ATRX* erano frequenti (86%), mentre erano rare le mutazioni di *TERT* (4%). Alcuni di questi sottotipi presentavano alterazioni del locus 4q12, che corrisponde al gene *PDGFRA*, al 12q14, in cui si trova il *CDK4*, o 8q24, che include il *MYC*. Questi dati sono in accordo con quelli di studi precedenti sul glioblastoma con mutazioni dell'*IDH* o *wild-type*. Nell'ambito dei gliomi con mutazioni *IDH* è stata individuata una progressione molecolare che inizia con questa mutazione ed è seguita dalla codelezione 1p/19q o dalla mutazione *TP53*. Nel caso di gliomi *wild-type* per *IDH* sono state riscontrate mutazioni in 7 geni, di cui 5 sono state riportate nel glioblastoma: *PTEN* (23%), *EGFR* (27%), *NF1* (20%), *TP53* (14%) e *PIK3CA* (9%). Sono state inoltre trovate nuove mutazioni nel gene *PTPN11* (7%) e *PLCG1* (5%). Duplicazioni del cromosoma 7 e delezioni del cromosoma 10 erano presenti in più del 50% dei tumori di questo sottotipo, mentre erano assenti nei gruppi con mutazioni *IDH*. Amplificazioni dei geni *EGFR*, *MDM4* e *CDK4* e delezioni dei geni *CDKN2A* e *RBI* erano le più frequenti *copy number variation* dei gliomi di basso grado *wild-type*, caratteristica comune ai glioblastomi *wild-type*. Sono stati individuati trascritti di fusione in 265 gliomi di basso grado correlati nel 44% dei casi con ri-arrangiamenti cromosomici, inclusi due dell'*EGFR*. Fusioni attivanti dei geni *EGFR* e *FGFR3* erano presenti nei gliomi *wild-type* ad una frequenza simile a quella dei glioblastomi. Per quanto riguarda i profili di espressione proteica, sono state riscontrate profonde differenze anche in questo caso tra i gliomi *wild-type* ed i gliomi con mutazioni *IDH*, come anche nell'attivazione delle vie dei recettori tirosin-chinasici nei *wild-type*, fornendo ulteriori evidenze della similitudine biologica tra i gliomi di basso grado *wild-type* ed i glioblastomi. È stata osservata nei tumori *wild-type* una iper-espressione dell'HER2, che rappresenta un potenziale target terapeutico. Nei gliomi con mutazione *IDH* e codelezione, invece, è stata osservata una più elevata espressione di HER3, marker di possibile resistenza agli inibitori della PI3 chinasi. I pazienti con gliomi *wild-type* erano più anziani di quelli con mutazione, e presentavano più frequentemente una storia familiare di cancro. I gliomi di basso grado con la mutazione *IDH* sono stati riscontrati più frequentemente nei lobi frontali rispetto ai *wild-type* ( $p < 0.05$ ). Tra i pazienti per i quali erano disponibili dati di *follow-up*, il 31% presentava una ricaduta, ed il 21% era deceduto. I pazienti *wild-type* presentavano una ridotta *overall survival* rispetto ai pazienti con gliomi con mutazioni *IDH*. La prognosi di questi pazienti (1,7 anni) era intermedia tra quella dei pazienti con glioblastoma *wild-type* (1,1 anni) e quella di pazienti con glioblastoma con *IDH* mutato (2,1 anni). I pazienti con glioma di basso grado con mutazione *IDH* e codelezione presentavano, invece, una sopravvivenza media di 8 anni, e quelli con mutazioni e senza codelezione di 6,3 anni.

Questo studio è stato condotto per delineare le basi biologiche dei gliomi di basso grado dell'adulto ed è stato concluso che lo status genetico (*IDH*, 1p/19q,) riflette meglio i sottotipi di malattia con diverso comportamento clinico rispetto all'istotipo. Sono state individuate tre classi di gliomi di basso grado, in base allo status *IDH* e codelezione 1p/19q. La maggior parte dei gliomi *wild-type* per l'*IDH* ha mostrato caratteristiche genetiche e cliniche simili a quelle del glioblastoma *wild-type*. Numerosi studi hanno mostrato come la classificazione istopatologica è soggetta ad una grande variabilità inter-osservatore, non correla con *marker* genetici e non predice accuratamente l'*outcome* clinico. Ulteriori risultati suggeriscono che i gliomi di basso grado *wild-type* sono dal punto di vista molecolare e clinico distinti dai gliomi con mutazione, e rappresentano probabilmente i precursori diretti del glioblastoma *wild-type*. In alternativa, potrebbe trattarsi di glioblastomi non adeguatamente campionati durante la chirurgia. La classificazione molecolare basata sullo status *IDH*-1p/19q rappresenta un miglioramento nella diagnostica poiché permette l'identificazione di forme aggressive di gliomi di basso grado in assenza di criteri morfologici per glioblastoma. È in corso l'acquisizione di dati dettagliati sui trattamenti e l'*outcome*, in modo da definire *marker* predittivi di risposta terapeutica. Sembra chiaro che diverse strategie terapeutiche sono richieste per un controllo efficace della malattia in diversi sottotipi molecolari di glioma.

In conclusione, questi dati forniscono il razionale per l'utilizzo dello status *IDH*/1p/19q codelezione come marker per l'individuazione di sottotipi di gliomi di basso grado e che alcuni sottotipi di gliomi a basso grado presentano un nucleo di vie di segnalazione precedentemente implicati nella patogenesi del glioblastoma, molti dei quali sono target di farmaci valutati in trial clinici.

**Parole chiave:** gliomi di basso grado, *IDH*-1p/19q status

#### Riferimento bibliografico

[Cancer Genome Atlas Research Network](#) *N Engl J Med* 2015, 372(26): 2481-98.

## IL PROFILO DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA PREDICE L'OUTCOME CLINICO ALLA TERAPIA BASATA SU CARBOLATINO/PACLITAXEL NEL MELANOMA METASTICO (TRIAL ECOG-ACRIN E2603)

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

L'incidenza del melanoma è aumentata progressivamente nel corso degli ultimi 30 anni con una stima di 76100 nuovi casi nel 2014 e 9700 morti. La prognosi in caso di tumore metastatico è scarsa con un tasso di sopravvivenza a 5 anni di circa il 6% e una sopravvivenza media tra i 6 e i 9 mesi. La chemioterapia carboplatino + paclitaxel (CP) è associata con tassi di risposta tra il 18 e il 20% in pazienti chemioterapia-naive e di circa 11-12% in quelli in seconda linea di trattamento. L'identificazione di markers di risposta e sopravvivenza è critica per migliorare l'*outcome* al trattamento. I microRNA, piccole molecole di RNA non codificante, possono regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale e giocano un ruolo importante nella regolazione degli oncosoppressori, degli oncogeni e di geni coinvolti in processi critici della carcinogenesi. Ad oggi, non vi sono studi che hanno esaminato i miRNA come possibili biomarkers predittivi della risposta alla chemioterapia nel melanoma metastatico (MM).

Date le suddette premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di identificare predittori molecolari di sopravvivenza e risposta a chemioterapia CP, in pazienti con MM. Tali pazienti sono stati arruolati nell'ambito del *trial* di fase III, E2603, volto a valutare la combinazione terapeutica sorafenib + chemioterapia CP.

Con lo scopo di individuare uno o più microRNA quali possibili biomarkers predittivi della risposta, sono state valutate l'espressione genica e quella dei miRNA, applicando un metodo innovativo per l'identificazione di cluster; successivamente, è stato generato un potenziale network genico regolatorio, volto a suggerire il ruolo dei miRNAs-biomarkers nel panorama del MM.

Nell'analisi sono stati inclusi 120 tessuti tumorali in paraffina provenienti da 115 pazienti arruolati nel trial E2603. I soggetti erano stati randomizzati in due bracci di trattamento, riceventi chemioterapia CP da sola o in associazione con sorafenib.



Il profiling dei miRNA è stato effettuato mediante tecnologia Nanostring che permette di analizzare contemporaneamente 800 microRNA, mentre l'analisi dell'espressione genica mediante piattaforma Illumina.

La PFS media dei 115 pazienti è stata di 4.4 mesi mentre l'OS di 9.8.

Tra i geni selezionati tramite specifico software *Tree-guided Recursive Cluster Selection (T-ReCS)*, PLXNB1 - un noto oncosoppressore del MM -, ha mostrato l'associazione più negativa con i valori di PFS ( $p=0.0001$ ); analogamente, anche RAD23 era negativamente associato con PFS.

Dal profiling dei microRNA, T-ReCS ha permesso di identificare miR-659-3p come il primo miRNA associato positivamente con PFS ( $p=0.008$ ). La clusterizzazione di quest'ultimo includeva tuttavia anche miR-219-3p e 519-5p. Questi microRNA avevano mostrato una scarsa o nulla associazione con PFS ( $p=0.036$  e  $p=0.12$ , rispettivamente). Tuttavia, esaminando questo cluster tramite regressione di Cox, i tre miRNA sono risultati positivamente associati con PFS. miR-659-3p non è risultato differenzialmente espresso sulla base del braccio del trattamento, o stato mutazionale.

Successivamente, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi sulla base della PFS in  $<$  di 4 mesi vs  $>$  4 mesi. Elevati livelli di espressione di miR-659-3p erano nuovamente associati con una PFS maggiore ( $p=0.03$ ) ed erano normalmente osservati in individui che raggiungevano una risposta oggettiva (risposta completa o parziale), se paragonati con quelli con malattia stabile ( $p=0.04$ ).

Infine, sono stati predetti i target di miR-659-3p, mediante appositi software in silico. Tra questi figuravano geni rilevanti nel *pathway* Pi3K/mTOR, delle MAP chinasi e geni della riparazione del DNA. L'espressione di questi non era significativamente anti-correlata con quella di miR-659-3p. Questo può dipendere dal fatto che normalmente i miRNA diminuiscono solo di poco l'espressione del loro target e ciò non si traduce in una significatività statistica. Un'anti-correlazione significativa è stata invece osservata per COG6, ENOX2, HCFC2, NFIX, SDC1 e TSC22D2. In particolare, NFIX, un membro della famiglia NF-1, sembra implicato nella progressione e sviluppo di molti processi biologici e malattie e il ruolo del *pathway* di NF-1 sta emergendo come potenziale target terapeutico.

In conclusione, questo studio ha messo in evidenza, mediante un'analisi integrata innovativa, il ruolo di miR-659-3p come potenziale biomarker di risposta in pazienti affetti da melanoma metastatico e trattati con chemioterapia basata sul platino.

**Parole chiave:** melanoma metastatico, chemioterapia basata sul platino, miR-569-3p

#### Riferimento bibliografico

[Villaruz LC](#) et al. *Clin Epigenetics* 2015, 7(1):58.

## ASSOCIAZIONE DEI POLIMORFISMI SU IL-8 ED ENOS CON L'ESITO CLINICO DI PAZIENTI AFFETTE DA TUMORE ALLA MAMMELLA IN TRATTAMENTO CON BEVACIZUMAB: UN'ANALISI ESPLORATIVA

A cura della Dott.ssa Sammarini

Il bevacizumab (Bev) si è dimostrato un farmaco efficace nel carcinoma del colon-retto avanzato, nel polmone non a piccole cellule e nel carcinoma ovarico, mentre la sua efficacia nel carcinoma mammario metastatico (mBC) risulta controverso. Sulla base dei risultati negativi ottenuti in differenti trial clinici, la FDA nel luglio 2010 ha preso la decisione di revocare l'approvazione di Bev nel mBC. Altre agenzie regolatorie, quali l'EMA, permette l'impiego di Bev nel carcinoma mammario avanzato come farmaco di prima linea, in combinazione con paclitaxel o con capecitabina, in quelle pazienti per i quali il trattamento con tassani o antracicline non è indicato. In questo studio è stata realizzata un'indagine esplorativa al fine di valutare se polimorfismi in geni implicati nel processo angiogenetico potessero influenzare la risposta al trattamento con Bev, includendo anche i geni coinvolti nei meccanismi di farmacoresistenza.

In questo studio retrospettivo, realizzato nella Divisione di Medicina Oncologica dell'ospedale Gemelli di Roma, sono stati inclusi 31 pazienti adulti con diagnosi confermata di cancro al seno metastatico HER2-negativo. Queste pazienti sono state trattate con Bev (15mg/Kg) e paclitaxel (175mg/m<sup>2</sup>), con o senza

carboplatino, ogni 3 settimane. I polimorfismi sono stati selezionati in base alla loro postulata capacità di modulare l'angiogenesi VEGF-dipendente o indipendente: eNOS-894 G/T (rs1799983), eNOS-786 T/C (rs2070744), COX2-8473 C/T (rs5275) e IL-8 251 T/A (rs4073). Il DNA da sangue periferico è stato estratto mediante l'utilizzo di un estrattore automatico ed i polimorfismi determinati mediante tecnica di PCR-RFLP. La PFS (sopravvivenza libera da progressione) è stata definita come il periodo intercorso fra il primo giorno di trattamento e la fine, intesa come il primo giorno in cui si è scorsa una progressione della malattia o la morte per qualunque causa. La OS (sopravvivenza globale) è stata indicata come il periodo intercorso fra l'inizio del trattamento fino alla morte per qualunque causa. La risposta al trattamento è stata controllata ogni 8 settimane, considerando la risposta completa come la scomparsa di tutti i target di lesione, parziale quella presentante una riduzione dei target di almeno il 30%, una stabilizzazione della patologia quando si è riscontrata una riduzione dei target inferiore al 30%, mentre la progressione è stata valutata quando si è presentato un aumento di target di lesione di almeno il 20% o la comparsa di nuove lesioni. L'associazione tra le varianti geniche e la sopravvivenza o la risposta è stata valutata tramite il test di Fisher.

Delle 31 pazienti analizzate, 25 presentavano un tumore recettore-ormonale positivo, 6 ne avevano uno al seno triplo negativo; una di queste aveva solo metastasi ossee, le altre 30 avevano un coinvolgimento del sistema viscerale, o di entrambi contemporaneamente. Fra queste pazienti, 18 (58.06%) avevano raggiunto una risposta parziale, 2 (6.45%) una totale, 9 (29.03%) avevano avuto una stabilizzazione della malattia mentre 2 (6.45%) erano andate incontro a progressione. Il tasso di sopravvivenza globale (ORR) è risultato del 64.51%, con una media di PFS di 12 mesi ed una OS media di 28.9 mesi. Relativamente alla variante IL-8 251T >A (rs4073), i soggetti omozigoti AA presentavano una PFS significativamente più bassa rispetto ai portatori della variante 251T (8 mesi vs 11 mesi, P= 0.01) ed una peggiore OS (26 mesi vs 51 mesi, P=0.04). Nell'analisi di eNOS-894T>C (rs1799983), i pazienti con genotipo TT avevano una PFS peggiore rispetto a GG (11.5 vs 26.5 mesi, P=0.04), mentre non sono state riscontrate differenze significative riguardo la OS. Non sono state riscontrate associazioni significative tra le altre varianti analizzate e la PFS o OS.

Attualmente non sono disponibili biomarkers prognostici o predittivi del trattamento con Bev nel carcinoma mammario metastatico. Tuttavia, l'importante ruolo giocato dal microambiente nel processo angiogenetico, ha fatto ipotizzare un ruolo dei polimorfismi di VEGF-A come possibili fattori predittivi. Il programma esploratorio sui biomarkers contenuto nel progetto AVADO ha recentemente mostrato che alti livelli basali di VEGF-A e VEGFR-2 nel plasma sono associati all'efficacia terapeutica con Bev. D'altra parte, un'analisi retrospettiva del trial E2100, ha concluso che l'amplificazione di VEGF-A potrebbe essere associata con uno scarso esito clinico, soprattutto nel cancro al seno HER2 positivo o triplo negativo. Numerosi studi supportano l'ipotesi secondo cui alti livelli di IL-8 potrebbero avere un ruolo chiave nello sviluppo della resistenza ai trattamenti antiangiogenetici. La relazione tra la variante IL-8 251T ed una maggiore PFS o OS, evidenziata in questo studio, supporta tale ipotesi dato che il genotipo IL-8 251 TT è stato associato ad una minore produzione di IL-8.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono una possibile associazione dei polimorfismi IL-8 251 T>A e eNOS-894 G>T con l'esito clinico al trattamento con bevacizumab nel carcinoma mammario metastatico.

**Parole chiave:** IL-8, eNOS, bevacizumab, resistenza; SNPs, carcinoma metastatico alla mammella

#### Riferimento bibliografico

[Di Salvatore M](#) et al. *Clin Transl Oncol* 2015 Jul 4 [Epub ahead of print].

## NEUROLOGIA

**IL POLIMORFISMO COMT Val158Met NON E' ASSOCIATO ALLA RISPOSTA CLINICA A LUNGO TERMINE NEL DISTURBO OSSESSIVO-COMPULSIVO NELLA POPOLAZIONE GIAPPONESE**

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

Il disturbo ossessivo-compulsivo (*obsessive-compulsive disorder*, OCD) è una malattia neuropsichiatrica che ha una prevalenza di circa il 2% ed è caratterizzata da pensieri ripetitivi e persistenti e da comportamenti ripetitivi e compulsivi. Nonostante si ritenga che fattori genetici ed ambientali siano coinvolti nell'eziologia dell'OCD, la fisiopatologia della malattia rimane poco chiara. Gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI) rappresentano il trattamento farmacologico di prima scelta per l'OCD, suggerendo che la malattia sia associata ad anomalie della trasmissione serotoninergica. Tuttavia, il 40-60% dei pazienti trattati con SSRI non traggono benefici da questa terapia. Crescenti evidenze provenienti da studi di *neuroimaging* indicano che anche alterazioni del sistema dopaminergico possano essere correlate all'OCD. Inoltre, antipsicotici che agiscono come antagonisti del recettore della dopamina vengono usati in associazione agli SSRI nei pazienti con OCD resistenti agli SSRI. Il gene che codifica per la catecol-O-metiltransferasi (*COMT*), che è uno dei principali enzimi coinvolti nella inattivazione metabolica della dopamina, è localizzato nella banda q11 del cromosoma 22, e l'allele Met del polimorfismo COMT Val158Met è associato ad una ridotta attività enzimatica. Ad oggi sono stati condotti diversi studi di associazione sul polimorfismo COMT Val158Met e OCD, in varie popolazioni, ma i risultati sono inconsistenti. Nel presente studio gli Autori per la prima volta hanno condotto uno studio di associazione *case-control* nella popolazione Giapponese per determinare se il polimorfismo COMT Val158Met fosse geneticamente implicato nell'OCD. Quindi, hanno indagato se questo polimorfismo fosse associato alla risposta clinica.

Nello studio sono stati reclutati 171 pazienti con OCD (81 maschi e 90 femmine, età media:  $33.8 \pm 11.0$  anni). La diagnosi di OCD è stata posta in accordo con i criteri del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV). I pazienti affetti da comorbidità con altri disturbi dell'asse I sono stati esclusi dallo studio. Tra i 171 pazienti con OCD, 91 hanno partecipato allo studio farmacogenetico. Questi pazienti sono stati valutati al *baseline* e alla fine di 3 e 36 mesi di trattamento (durata media del *follow-up*:  $13.1 \pm 8.2$  mesi) con la *Yale Brown Obsessive-Compulsive Scale* (Y-BOCS). I pazienti sono stati divisi in 3 gruppi, in base alla risposta farmacologica. Al gruppo A appartenevano i pazienti che avevano avuto una riduzione di oltre il 35% del punteggio alla Y-BOCS dopo trattamento con SSRI; i pazienti del gruppo A sono stati trattati con alte dosi di uno dei seguenti farmaci antidepressivi (fluvoxamina, paroxetina, sertralina o escitalopram). Al gruppo B appartenevano i pazienti con OCD refrattari al trattamento con SSRI che mostravano una riduzione di oltre il 35% del punteggio alla Y-BOCS dopo l'aggiunta di antipsicotici. I pazienti che non rispondevano né agli SSRI né agli SSRI più antipsicotici erano classificati come gruppo C. Questi pazienti sono stati trattati con basse dosi di uno dei seguenti farmaci antipsicotici (risperidone, olanzapina, quetiapina, perospirone o aripiprazolo). Il gruppo di controllo comprendeva 944 volontari (303 maschi e 641 femmine, età media:  $41.6 \pm 12.2$  anni). La genotipizzazione del polimorfismo COMT Val158Met (rs4680) è stata effettuata tramite sonde TaqMan con *Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System*.

I risultati del presente studio non hanno mostrato un effetto significativo dell'allele Met del polimorfismo COMT Val158Met (rs4680) sul rischio di OCD (per-allele OR, 1.15; 95% CI, 0.90-1.48;  $p=0.27$ ). Per quanto riguarda l'associazione di questo polimorfismo con la risposta clinica dei pazienti affetti da OCD non è stato rilevato un effetto significativo dell'allele Met quando è stato esaminato l'effetto di rs4680 sulla risposta clinica agli SSRI (gruppo A vs. gruppo B più C; per-allele OR, 1.40; 95% CI, 0.76-2.58;  $p=0.28$ ) o sulla risposta clinica agli SSRI in associazione ad un farmaco antipsicotico (gruppo B vs. gruppo C; per-allele OR, 0.37; 95% CI, 0.18-1.06;  $p=0.06$ ).

Gli Autori del presente studio non hanno trovato un'associazione significativa tra l'allele Met e l'OCD nella popolazione Giapponese considerata, dato consistente con i risultati di precedenti studi. Tuttavia, la meta-analisi di precedenti studi genetici di associazione ha dimostrato che il polimorfismo COMT Val158Met è un fattore di rischio per lo sviluppo dell'OCD. Tale discrepanza potrebbe essere dovuta alla mancanza, nel presente studio, di un adeguato potere statistico che rilevi l'effetto genetico relativamente piccolo di questo polimorfismo sull'OCD o sulle differenze etniche. In questo studio è stato dimostrato che il polimorfismo COMT Val158Met non è associato alla risposta terapeutica agli SSRI o agli SSRI in associazione ad antipsicotici atipici nell'OCD. Questo è il primo studio che esamina l'effetto del polimorfismo COMT Val158Met sulla risposta al trattamento a lungo termine nell'OCD.



Il presente studio presenta diverse limitazioni. Primo, la dimensione del campione dei pazienti con OCD che hanno partecipato allo studio farmacogenetico *case-control* è piccolo. Pertanto, saranno necessari ulteriori studi su campioni di popolazione più ampi. Secondo, i pazienti sono stati trattati con un'ampia varietà di farmaci. Terzo, il periodo di *follow-up* non è stato unificato. Infine, nel presente studio non sono state investigate eventuali interazioni tra il gene *COMT* e altri geni, quali il *5-HTTLPR* e il *5-HT2A* che sono stati associati alla risposta farmacologica nell'OCD.

In conclusione, il presente studio non rileva una significativa associazione del polimorfismo *COMT* Val158Met con la risposta clinica a lungo termine nel disturbo ossessivo-compulsivo nella popolazione Giapponese.

**Parole chiave:** disturbo ossessivo-compulsivo, *COMT*, meta-analisi, risposta clinica

#### Riferimento bibliografico

[Umehara H](#) et al. *Hum. Psychopharmacol* 2015 May 26 [Epub ahead of print]

## CARDIOVASCOLARE

### I GENI *TET2* E *CSMD1* MODULANO LA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON IDROCLOROTIAZIDE IN PAZIENTI NAÏVE AFFETTI DA IPERTENSIONE ESSENZIALE

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

I diuretici tiazidici rappresentano i farmaci di prima linea per il trattamento dell'ipertensione lieve. Si tratta di farmaci caratterizzati da un buon profilo di efficacia, sicurezza e tollerabilità. Agiscono inibendo il trasporto di sodio-potassio-cloro a livello del tubulo distale del nefrone e inducono un aumento dell'escrezione nell'urina di acqua ed elettroliti, quali sodio, potassio, cloruro e magnesio. Riducono, inoltre, la resistenza arteriosa periferica attivando i canali del potassio calcio-dipendenti ed inibendo alcune anidrasi carboniche del tessuto vascolare. L'ipertensione essenziale è nota per essere una patologia poligenica influenzata dall'interazione tra il background genetico individuale e fattori ambientali. Evidenze in letteratura suggeriscono una correlazione tra alcuni geni, quali *ADD1*, *WNK1*, *NEDD4L* e *ACE*, e la risposta al trattamento con diuretici tiazidici. Non essendo ad ora esaustiva l'analisi della correlazione tra variabilità genetica e risposta a diuretici tiazidici, è stato ivi condotto uno studio di associazione *genome-wide* mirato ad individuare nuovi loci genetici associati alla risposta a idroclorotiazide in due coorti di pazienti italiani affetti da ipertensione essenziale.

Lo studio di associazione *genome-wide* nella sua fase esploratoria è stato condotto su due coorti di pazienti arruolati, rispettivamente, presso il "Centro Ipertensione Arteriosa e Malattie Correlate" dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari (coorte PHSS: n= 401) e presso l' "Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi ed Ipertensione" dell'Istituto Scientifico Universitario San Raffaele di Milano (coorte HCTZ-Milan: n=215). Nello specifico, presso il centro di Sassari sono stati inizialmente reclutati 601 pazienti caucasici affetti da ipertensione essenziale lieve-moderata (naïve per il trattamento) i cui valori di pressione sanguigna fossero di almeno 140/90 mmHg al momento della prima visita (settimana -8). Nelle 8 settimane successive a tale visita, i pazienti sono stati sottoposti ad un regime dietetico controllato (sodio: 100-140 mEq/die; potassio: 50-70 mEq/die). Al termine di queste 8 settimane (settimana 0) sono stati esclusi dallo studio 146 pazienti che presentavano: i) normalizzazione spontanea della pressione sanguigna; ii) sintomi correlati ad elevata pressione sanguigna; iii) peggioramento dei valori pressori. Ai rimanenti 455 pazienti è stata somministrata idroclorotiazide (25 mg per os) per le 8 settimane successive. Sono state infine esclusi dallo studio 7 pazienti per scarsa compliance al trattamento ed altri 47 per insorgenza di ipocalcemia. La coorte di pazienti arruolati presso l'Istituto Scientifico Universitario San Raffaele di Milano constava inizialmente di 232 pazienti affetti ipertensione primaria (naïve per il trattamento) con valori di pressione sanguigna di

almeno 140/90 mmHg. Una volta sottoposti a regime dietetico controllato per 4 settimane (sodio < 150mmol/die), sono stati esclusi dallo studio 4 pazienti. I restanti 228 hanno assunto idroclorotiazide alla dose di 12.5 mg/die per le prime 4 settimane e alla dose di 25 mg/die per le successive 4 settimane. Durante le 8 settimane di trattamento sono stati esclusi 13 pazienti, di cui 6 per scarsa compliance, 4 per effetti avversi, 2 per peggioramento dei valori pressori e 1 perso al follow-up. La risposta al trattamento con idroclorotiazide è stata valutata come differenza tra i valori di pressione sistolica ( $\Delta$ SBP8) e diastolica ( $\Delta$ DBP8) misurati al termine del trattamento (settimana 8) e quelli misurati prima dell'inizio del trattamento (settimana 0). Il DNA dei pazienti arruolati per entrambi le coorti è stato estratto da campioni di sangue periferico e genotipizzato tramite Illumina Human1M-Duo array. I risultati ottenuti nella fase esploratoria sono stati poi validati in 5 coorti indipendenti di pazienti ipertesi di origine europea: GENRES (n=214), GERA (n=282), NORDIL (n=383), PEAR (n=228), CSN-StayOnDiur (n=438).

Dopo controllo di qualità, i dati di 343 su 401 pazienti appartenenti alla coorte PHSS sono stati inseriti nell'analisi di associazione. Di questi, 120 soggetti erano di sesso femminile (35%) e la pressione sanguigna media nella coorte era in media di 158.6 ( $\pm$ 13.4)/103 ( $\pm$ 7.7) mmHg. Per quanto riguarda la coorte HCTZ-Milan, sono stati inseriti nell'analisi *genome-wide* i dati di 142 pazienti sui 215 totali. Di questi, 24 (17%) erano di sesso femminile e la pressione sanguigna media era di 153.5 ( $\pm$ 10.6)/101.5 ( $\pm$ 7.4) mmHg. Dall'analisi di regressione lineare seguita da meta-analisi dei risultati delle due coorti, non è emersa nessuna associazione *genome-wide* tra le varianti analizzate e la risposta alla terapia con idroclorotiazide, espressa in termini di  $\Delta$ SBP8 e di  $\Delta$ DBP8. Sulla base del q-q plot ottenuto, gli Autori hanno considerato significative le varianti genetiche con un P value di associazione <  $10^{-5}$ . Sono state quindi selezionate 141 varianti associate a  $\Delta$ SBP8 e 130 correlate a  $\Delta$ DBP8. Una volta esclusi gli SNPs in forte linkage disequilibrium tra loro, sono stati identificati 6 SNPs come associati a  $\Delta$ SBP8: rs12505746 nel gene TET2 (P=9.40 X  $10^{-6}$ ), rs7387065 e rs11993031 in CSMD1 (rispettivamente: P=1.71 X  $10^{-6}$ , P=7.65 X  $10^{-6}$ ), rs9285669 in SPINK14 (P=7.09 X  $10^{-7}$ ), rs11189015 in SLIT1 (P=4.54 X  $10^{-6}$ ) e rs9915451 in ANKFN1 (P=4.01 X  $10^{-6}$ ). Sono, invece, 5 gli SNP correlati a  $\Delta$ DBP8: rs4431329 e rs7706429 nel gene FBXL17 (rispettivamente, P=1.28 X  $10^{-6}$ , P=3.01 X  $10^{-6}$ ), rs9590353 in UGGT2 (P=5.39 X  $10^{-6}$ ), rs113095083 in ILKAP (P=6.37 X  $10^{-6}$ ) e rs77876672 in DIAPH3 (P=9.47 X  $10^{-6}$ ). Questi 11 SNPs sono stati poi replicati in 5 coorti indipendenti di pazienti ipertesi. Lo SNP rs7387065 nel gene CSMD1 è emerso come associato ad una riduzione della pressione sistolica nella coorte GENRES (P=0.04). Inoltre, lo SNP rs12505746 in TET2 ha mostrato un trend di associazione con la riduzione della pressione diastolica nella medesima coorte (P=0.02). Infine, la variante rs9590353 nel gene UGGT2 è risultata essere correlata a  $\Delta$ DBP8 nella coorte CSN-StayOnDiur (P=0.04).

La variante rs12505746 nel gene TET2 e i due SNPs rs7387065 e rs11993031 del gene CSMD1 sono emersi come i più plausibili fattori genetici predittivi della risposta alla terapia con idroclorotiazide nei pazienti ipertesi di origine caucasica. Il gene TET2 codifica per l'omonima proteina nota per avere un ruolo chiave nella demetilazione attiva del DNA. Un recente studio (Yu *et al. Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305:F1006-F1013) ha dimostrato che l'aldosterone stimola la proteina TET2 a demetilare il promotore del gene  $\alpha$ ENaC, codificante per il canale epiteliale del sodio alfa, promuovendone la trascrizione. È noto come l'aldosterone aumenti il riassorbimento tubulare di sodio incrementando la trascrizione di  $\alpha$ ENaC nelle cellule del dotto collettore. Essendo la ritenzione di sodio uno dei principali meccanismi sottesi alla regolazione della pressione sanguigna, gli Autori ipotizzano che TET2 possa essere implicato nel modulare la pressione sanguigna e quindi la risposta ad idroclorotiazide nei pazienti ipertesi. Il gene CSMD1 codifica, invece, per una proteina transmembrana appartenente alla famiglia delle proteine vacuolari-sorting-13. Nonostante il ruolo di tali proteine nell'uomo non sia ad ora noto, tale gene è emerso come associato ad un maggior rischio di ipertensione in due studi caso-controllo.

*Principali limitazioni dello studio:* i) l'eterogeneità, in termini di fenotipo e disegno dello studio, delle coorti di pazienti inclusi nella fase di replicazione può aver ridotto la probabilità di validare i risultati ottenuti nella fase esploratoria; ii) lo studio ha un potere statistico insufficiente per valutare l'associazione tra SNPs rari e l'outcome analizzato; iii) le varianti emerse come associate dallo studio *genome-wide* sono introniche: si ipotizza quindi che questi polimorfismi possano essere in linkage disequilibrium con varianti genetiche funzionali implicate, ad esempio, nella regolazione dell'espressione proteica. Nell'insieme, tali limitazioni rendono complessa la comprensione del potenziale ruolo funzionale di tali varianti nel modulare la risposta ad idroclorotiazide.

Gli SNPs rs12505746 nel gene TET2 nonché rs7387065 e rs11993031 del gene CSMD1 sono dei potenziali fattori genetici predittivi della risposta ad idroclorotiazide in pazienti caucasici affetti da ipertensione lieve-moderata.

**Parole chiave:** idroclorotiazide, ipertensione, TET2, CSMD1

#### Riferimento bibliografico

[Chittani M](#) et al. J Hypertens. 2015, 33(6):1301-9.

## I POLIMORFISMI NEL GENE URAT1 INFLUENZANO L'EFFETTO URICOSURICO DEL LOSARTAN NEI PAZIENTI IPERTESI CON IPERURICEMIA

A cura della Dott.ssa Valentina Manzo

Il losartan, un farmaco ampiamente utilizzato per il trattamento dell'ipertensione arteriosa, possiede un effetto uricosurico. In generale, i farmaci uricosurici agiscono sul tubulo prossimale del rene, dove interferiscono con il riassorbimento di acido urico dall'ultrafiltrato al sangue. Il meccanismo d'azione di diversi uricosurici è l'inibizione della funzionalità del trasportatore degli urati 1 (URAT1). URAT1 funge da contro-trasportatore tra acido urico e anioni ed è situato a livello della membrana luminale delle cellule epiteliali del tubulo renale prossimale. Studi *in vivo* hanno dimostrato che il losartan regola in maniera negativa l'espressione del gene URAT1 con conseguente riduzione di acido urico sierico. Tuttavia, tale farmaco presenta una variabilità nella risposta terapeutica e il suo meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiarito. Lo scopo di questo studio è stato valutare l'associazione tra i polimorfismi rs1529909 (T/C) e rs3825016 (C/T) del gene URAT1 e l'uricemia, e l'impatto di tali varianti sull'effetto uricosurico del losartan in pazienti ipertesi con iperuricemia.

Centouno pazienti ipertesi con iperuricemia (53 pazienti di sesso femminile e 48 pazienti di sesso maschile) di età media di  $64 \pm 15$  anni e 117 controlli sani (57 soggetti di sesso femminile e 60 di sesso maschile) di età media di  $64,6 \pm 12,9$  anni sono stati arruolati presso l'Ospedale *Xiangya* in Cina. Pazienti con pressione arteriosa sistolica (SBP)  $>140$  mmHg e/o pressione arteriosa diastolica (DBP)  $>90$  mmHg sono stati classificati come ipertesi. L'iperuricemia è stata definita come il livello di acido urico nel sangue  $>7$  mg/dl ( $416$   $\mu$ mol/l) negli uomini e  $>6$  mg/dl ( $357$   $\mu$ mol/l) nelle donne. I pazienti ipertesi sono stati stratificati in base al genotipo e a tutti è stata prescritta una dose orale giornaliera di losartan di 100 mg per due settimane consecutive. I criteri di esclusione erano la presenza di gotta, calcolosi renale e altre patologie metaboliche; consumo di droghe e abuso di alcool; utilizzo di farmaci influenzanti i livelli di acido urico nel siero o il volume delle urine; la gravidanza o l'allattamento. Per ogni paziente arruolato è stato registrato il peso, l'altezza, l'indice di massa corporea (BMI) e i valori di pressione arteriosa ed è stato prelevato un campione di sangue periferico. Nei campioni di sangue sono stati dosati i livelli di nitrogene ureico (BUN), creatinina sierica (Cr), acido urico sierico (SUA), elettroliti, colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi. Il polimorfismo rs3825016 (C/T) è stato analizzato mediante sequenziamento diretto, mentre per il polimorfismo rs1529909 (T/C) è stata effettuata una digestione enzimatica seguita da sequenziamento diretto.

I risultati hanno evidenziato differenze statisticamente significative, tra i soggetti ipertesi e i controlli, dei valori di BMI ( $p=0.001$ ), Cr ( $p<0.001$ ), SUA ( $p<0.001$ ), BUN ( $p<0.001$ ), concentrazione plasmatica di HDL ( $p=0.008$ ) e LDL ( $p=0.014$ ), SBP ( $p<0.001$ ) e DBP ( $p<0.001$ ). Al contrario, sesso, età, concentrazione ematica di nitrogene ureico/creatinina (BUN/Cr), colesterolo totale e trigliceridi non erano statisticamente differenti tra i due gruppi di pazienti. La frequenza dell'allele C del polimorfismo rs1529909-URAT1 era pari al 33,7% nei pazienti ipertesi con iperuricemia e al 32,1% nei controlli sani, mentre le frequenze dell'allele T del polimorfismo rs3825016-URAT1 erano del 20,3% e 14,5%, rispettivamente, nei pazienti ipertesi e nei controlli. La frequenza del genotipo CT per lo SNP rs3825016 era significativamente più alta nei pazienti ipertesi rispetto a quella dei donatori sani (32,7% vs 18,8%,  $p=0.02$ ).

Le caratteristiche cliniche basali dei 101 pazienti stratificati per genotipo erano sovrapponibili tra loro. In seguito al trattamento con il losartan si è verificata una riduzione dei valori di SUA ( $p<0.001$ ), Cr ( $p<0.001$ ),

BUN ( $p < 0.001$ ), LDL ( $p = 0.040$ ), SBP ( $p < 0.001$ ) e DBP ( $p < 0.001$ ). Inoltre, nei pazienti con i genotipi CT+TT del polimorfismo rs3825016, i valori di SUA erano significativamente più bassi di quelli dei soggetti con il genotipo CC ( $p < 0.01$ ). Allo stesso modo, i pazienti con i genotipi CC+CT dello SNP rs1529909 avevano valori più bassi di SUA, Cr e BUN/Cr rispetto ai pazienti con genotipo TT (tutte le  $p < 0.05$ ). Infine, per valutare l'impatto dei genotipi mutati sull'effetto uricosurico del losartan, sono stati confrontati i valori di  $\Delta$ SUA ( $\Delta$ SUA = valori di SUA post-trattamento - i valori di SUA pre-trattamento) dei pazienti WT per entrambi i polimorfismi (WT/WT) con quello dei pazienti portatori delle mutazioni (MUT/MUT). I risultati hanno mostrato che, combinando insieme le due varianti polimorfiche, i valori di  $\Delta$ SUA erano inferiori nei pazienti MUT/MUT rispetto a quelli registrati nei pazienti WT/WT ( $p < 0.0001$ ).

Il losartan, come farmaco antagonista del recettore dell'angiotensina II, esplica la sua azione antiipertensiva bloccando l'attivazione dei recettori AT1 dell'angiotensina II e provocando, così, vasodilatazione e riduzione della pressione arteriosa. E' noto, inoltre, che possa diminuire i livelli sierici di acido urico in maniera dose-dipendente. Molti studi si sono focalizzati sul meccanismo antiipertensivo del losartan ma nessuno sul suo effetto uricosurico. Tale farmaco sembra diminuire i valori di acido urico sierico tramite l'inibizione dell'mRNA del gene URAT1, coinvolto nel metabolismo dell'acido urico. In particolare, in questo studio, gli autori hanno focalizzato la loro attenzione sulla possibile associazione tra due SNP del gene URAT1 e l'uricemia. Il polimorfismo rs3825016 (C/T) è localizzato nell'esone 1 del gene, in prossimità del promotore, e sembrerebbe alterare la conformazione e la stabilità della proteina. Lo SNP rs1529909 (T/C), invece, è localizzato nell'introne 4. Questo SNP potrebbe modulare il trasportatore degli urati 1 poiché è strettamente associato ad un altro polimorfismo (rs893006) del gene URAT1, situato anch'esso nell'introne 4, identificato come regolatore di tale proteina. Diversi autori hanno valutato le frequenze alleliche dei polimorfismi rs3825016-URAT1 e rs1529909-URAT1; in particolare sono stati effettuati studi su popolazioni caucasiche (nei tedeschi) e non (nei giapponesi). Le frequenze ottenute in questo lavoro sono molto simili a quelle ottenute nella popolazione caucasica, sebbene i pazienti analizzati non fossero Caucasici. Pertanto, saranno necessari ulteriori studi in coorti di pazienti più numerose e di diversa etnia per confermare i risultati ottenuti in questo lavoro.

Questo studio dimostra che i polimorfismi rs3825016 (C/T) e rs1529909 (T/C) del gene URAT1 influenzano l'azione uricosurica del losartan nei pazienti ipertesi con iperuricemia. L'analisi di altre varianti polimorfiche eventualmente coinvolte nel meccanismo uricosurico del losartan potrebbe portare ad un'ottimizzazione della terapia per i pazienti in trattamento con tale farmaco.

In ultimo, è doveroso sottolineare che in questo lavoro si possono ravvisare alcune imprecisioni; in particolare, i numeri dei pazienti di sesso maschile e femminile risultano differenti se si confrontano tra loro le tabelle. Nella tabella 1, infatti, il rapporto pz uomini/pz donne è 48/53, mentre nella tabella 5 i rapporti sono 69/32 per il polimorfismo rs1529909 e 68/33 per il polimorfismo rs3825016.

**Parole chiave:** losartan, acido urico sierico, URAT1

#### Riferimento bibliografico

[Sun H](#) et al. *Pharmacogenomics* 2015, 16(8):855-63.

---

## REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA DI TRASFERIMENTO DEGLI ESTERI DEL COLESTEROLO DA PARTE DI POLIMORFISMI "UPSTREAM": RIDOTTA ESPRESSIONE ASSOCIATA A RS247616

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

La proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) è coinvolta nel trasporto inverso del colesterolo dalla periferia al fegato, dove il colesterolo è convertito in acidi biliari e poi escreto. Molto espressa nella milza e nel fegato, CETP è immessa nella circolazione, dove facilita il trasferimento degli esteri del colesterolo dalle lipoproteine ad alta densità (HDL) alle lipoproteine a bassa densità (LDL), in cambio di trigliceridi. L'aumento di attività della CETP riduce il rapporto HDL/colesterolo totale, che è

associato ad un aumento del rischio di malattie coronariche (CAD). Deficit genetici di CETP, con conseguente aumento del colesterolo HDL (HDL<sub>c</sub>) e diminuzione del colesterolo LDL (LDL<sub>c</sub>) nelle popolazioni giapponesi, provocano varie alterazioni cardiovascolari, ed è stato riportato anche un effetto antiaterogeno o aterogeno. L'inibizione della CETP è stata bersaglio di molti farmaci; tuttavia, i primi risultati clinici non hanno mostrato alcun beneficio o miglioramento del rischio. Le varianti di CETP sono state associate ai livelli di HDL; tuttavia, gli effetti osservati sul rischio di CAD sono deboli. L'allele minore del marcatore Taq1B (rs708272) è stato associato ad una ridotta attività di CETP e ad una ridotta risposta alla terapia con statine, suggerendo una possibile interazione gene-farmaco. E' stato dimostrato da studi "genomewide" di associazione e studi di genetica molecolare, che la regolazione dell'espressione di CETP è influenzata in modo significativo da polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) presenti nella regione a monte del gene (5-10kb *upstream*). Diversi SNPs in questa regione sono in forte *linkage disequilibrium* (LD) tra di loro in un lungo blocco di aplotipo che si estende in tutta la regione a monte della porzione 5' di CETP dove è compreso Taq1B. Gli SNPs *enhancer* a monte del gene (rs247616, rs173539, e rs3764261), in LD parziale con Taq1B, sono risultati associati con l'espressione del mRNA di CETP nel fegato, una ridotta attività di CETP e aumentati livelli di HDL<sub>c</sub>. Successivamente, Leusink et al. hanno scoperto che la variante *enhancer* rs3764261 di CETP, in LD parziale con Taq1B ( $R^2 = 0,442$ ,  $D' = 0,886$ ) e in forte LD con rs247616 ( $R^2 = 1$ ,  $D' = 1$ ), è associata anche ad una minore efficacia delle statine nel prevenire CAD. Inoltre, uno "splicing" SNP (rs5883), che genera un mRNA mancante dell'esone 9 ed una proteina priva dell'attività di trasferimento degli esteri del colesterolo, è stato trovato associato ad una ridotta attività di CETP ed un aumento dei livelli di HDL<sub>c</sub>. Ad oggi, gli studi genetici sono stati effettuati solo su topi transgenici utilizzando sequenze CETP umane o di scimmie. Tuttavia, le regioni di CETP inserite non includevano le regioni *enhancer*, situate a monte della CETP, e i topi non esprimevano fisiologicamente la CETP. Pertanto, sono necessari ulteriori studi per comprendere la complessa regolazione di CETP negli esseri umani. Dall'analisi dello sbilanciamento dell'espressione allelica (AEI) in fegati umani e la sua associazione con il genotipo, gli autori hanno precedentemente identificato come variante probabilmente responsabile della ridotta espressione di mRNA di CETP il polimorfismo rs247616. Tuttavia, altre varianti nel promotore/*enhancer* potrebbero causare o contribuire alla trascrizione di CETP, ed è probabile che CETP potrebbe avere varianti regolatorie multiple.

L'attuale studio è finalizzato a determinare il ruolo di rs247616 nella regolazione dell'espressione del mRNA di CETP, e capire se questa è l'unica variante responsabile del AEI osservato, se è in forte LD con un SNP funzionale, o se agisce in concerto con altre varianti funzionali.

**Identificazione della struttura linkage rs247616.** Sono stati analizzati i genotipi del progetto 1000 Genomi ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)) utilizzando il programma PLINK (Harvard). E' stato valutato il LD nei caucasici, delle varianti fino a 30 Mb a monte e a valle del rs247616. **Associazione con l'espressione nei tessuti.** E' stata analizzata l'associazione tra ciascun SNP e l'espressione di CETP nel fegato, milza, e tra 53 tipi di tessuto utilizzando i genotipi e i dati di espressione RNA-Seq con il database *Genotype-Tissue Expression* (GTEx, <http://www.gtexportal.org>, Broad Institute). I dati del genotipo erano accessibili attraverso il progetto dbGAP 5358 del *Institutional Review Board protocol 2013H0096*. La significatività dell'associazione è stata determinata utilizzando il t test. **Previsione dei siti di legame dei fattori di trascrizione.** Il software MatInspector (Genomatix, Monaco di Baviera, Germania) è stato utilizzato per prevedere i siti di legame dei fattori di trascrizione persi o guadagnati dall'allele minore degli SNPs trovati mediante sequenziamento. Potenziali interazioni tra SNPs e i fattori di trascrizione sono state valutate mediante ENCODE, utilizzando il *browser UCSC genoma*. **Analisi di coespressione.** Utilizzando i dati del progetto GTEx, gli autori hanno correlato l'espressione di CETP nei campioni di fegato e milza con l'espressione dei fattori di trascrizione che sono stati trovati influenzati da SNPs in LD con SNP candidato, rs247616 (n=19). Il pacchetto statistico, R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), è stato utilizzato per correlare i dati di espressione. **Valutazione dell'attività enhancer mediante espressione della luciferasi con gene reporter assay.** Per valutare l'effetto dell'allele minore di un SNP sull'espressione, è stata inserita la regione *enhancer* candidata, contenente sia l'allele maggiore che minore, nel sito di clonaggio multiplo di un vettore di espressione con promotore minimo della luciferasi PGL-4.23 (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Una regione di circa 400bps intorno al SNP candidato è stata amplificata mediante PCR. Il vettore è stato trasformato in *Escherichia coli* XL-10 gold. Le colonie sono state isolate e validate dalla genotipizzazione per SNP. La sequenza degli inserti rimanenti è stata confermata tramite sequenziamento Sanger. Tre colonie validate per ogni inserto sono state selezionate e combinate per il test di espressione della luciferasi. Ogni



vettore di espressione è stato cotrasfettato nelle cellule HEK-293 e HepG2 con un vettore sotto il controllo della renilla luciferasi utilizzando Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

**Identificazione della struttura linkage rs247616.** Tredici SNPs hanno mostrato un  $R^2$  superiore a 0,77. Altri tre SNPs hanno rivelato un  $R^2$  minore di 0,77 e maggiore di 0,50, di cui tutti altamente in linkage con Taq1B (rs708272). Questi SNPs non sono stati inclusi nell'analisi a causa della mancanza di associazione di rs708272 con AEI per CETP nel fegato. Ciò indica che questi tre SNPs difficilmente possono essere varianti regolatorie dell'espressione del mRNA di CETP. **Associazione tra le varianti di CETP e l'espressione del suo mRNA nei tessuti umani.** Utilizzando il t test, è stata rilevata un'associazione significativa tra la bassa espressione di CETP nella milza, in cui l'mRNA di CETP è fortemente espresso, e l'allele minore di ogni SNP ( $P=0,008$ ), indicando che questo blocco di aplotipo è importante per la regolazione dell'espressione di CETP. Nel fegato è stata osservata un'espressione media leggermente inferiore (520 vs 396 conteggi per 0 vs 2 alleli), ma non significativa ( $P=0,63$ ). Quando analizzati insieme, tutti i tessuti sequenziati da GTEx hanno mostrato una significativa associazione ( $P=0,024$ ). Inoltre, i campioni sono stati stratificati per genotipo del rs247616 ma non è stato trovato alcun SNP addizionale rimasto significativo dopo correzione di Bonferroni per test multipli. **Previsione dei siti di legame dei fattori di trascrizione** I risultati hanno rivelato che diverse varianti presenti nell'aplotipo "upstream", compresi rs247616, rs173539 e rs17231506, causano la distruzione o la generazione di siti di legame per i fattori di trascrizione. rs247616 altera fortemente i siti putativi di legame sia di *Y-box binding protein 1* (YBX1) che di *CCAAT/enhancer  $\alpha$  binding protein* (CEBPA). L'allele minore del rs17231506 provoca un cambiamento favorevole nel sito di legame per *hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$*  (HNF4A). Inoltre, l'allele minore del rs173539 aumenta lo score di legame per l'eterodimero *retinoid X receptor- $\alpha$ /retinoic acid receptor- $\alpha$*  (RXRA/RARA). L'analisi dei dati di ChIP, all'interno del progetto ENCODE, non ha rivelato alcun legame per i fattori di trascrizione per cui era stata predetta l'interazione con gli SNPs di CETP. Tuttavia, alcuni SNP, quali rs72786786 e rs247617 hanno mostrato un'interazione con il fattore di trascrizione CTCF (*CCCTC-binding factor*). **Analisi di coespressione tra CETP e i fattori di trascrizione.** Sono stati confrontati i livelli di espressione di 19 fattori di trascrizione, che potenzialmente interagiscono con gli SNPs candidati, con i livelli di CETPs nel fegato ( $n=35$ ) e nella milza ( $n=35$ ), sequenziati dal consorzio GTEx. Utilizzando il pacchetto statistico R, sono stati correlati i livelli di espressione dei fattori di trascrizione con il coefficiente di correlazione " $\tau$ " (tau) di Kendall per individuare le coppie concordi e discordi. Dopo aver aggiustato il *p-value* per la correzione di Benjamini-Hochberg, nessun fattore di trascrizione ha mostrato un aumento statisticamente significativo di correlazione con l'espressione di CETP. L'analisi multivariata dell'espressione di CETP, dell'espressione dei fattori di trascrizione, e dell'interazione con il genotipo del SNP non ha mostrato alcun risultato significativo dopo la correzione dei test multipli. Questo indica che nessun fattore di trascrizione ha un'influenza sufficiente ad alterare l'espressione epatica o splenica di CETP. **Valutazione dell'attività enhancer mediante espressione della luciferasi con gene reporter assay.** È stato utilizzato un *reporter assay* per esaminare gli effetti del rs247616, rs173539 e rs17231506 sull'espressione del gene reporter della luciferasi. I risultati hanno mostrato che rs247616 e rs173539 alterano significativamente l'espressione della luciferasi sia in HEK-293 che HepG2. L'allele minore del rs247616 ha prodotto una diminuzione dell'espressione del gene reporter di 1,7 volte rispetto all'allele maggiore in entrambe le linee cellulari ( $P<0,001$ ). L'allele minore del rs173539 ha indotto un aumento dell'espressione di più di due volte rispetto all'allele maggiore, su entrambe le linee cellulari ( $P=0,003-0,005$ ). Nessuna differenza significativa sull'espressione è stata invece osservata tra l'allele maggiore e minore del rs17231506 nelle cellule HepG2, con una piccola riduzione osservata nelle cellule HEK-293 ( $P=0,05$ ).

In sintesi, gli SNP rs247616 e rs173539 sono in forte *linkage disequilibrium* ( $R^2=0,96$ ,  $D'=1,00$ ) e sono potenzialmente in grado di regolare l'espressione di CETP. Sebbene gli effetti opposti osservati, suggeriscano che la regolazione di CETP possa variare nei diversi tessuti, l'allele minore di rs247616 e gli SNPs in forte LD sono stati trovati associati ad una ridotta espressione in tutti i tessuti.

**Parole chiave:** metabolismo del colesterolo, proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo, espressione genica, genetica, lipoproteine ad alta densità, lipoproteine a bassa densità, genetica molecolare, statine, trascrizione

#### Riferimento bibliografico

Suhy A et al. *Pharmacogenet Genomics* 2015, 25(8):394-401.



## IMMUNOMODULAZIONE

### CORRELAZIONE TRA IL MICRORNA-186 PLASMATICO E PROTEINURIA NELLA GLOMERULOSCLEROSI FOCALE SEGMENTALE

A cura delle Dott.sse Marianna Lucafò e Eva Cuzzoni

La glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS) è una delle cause più frequenti di sindrome nefrosica in adulti e bambini. I pazienti con proteinuria persistente grave tendono a progredire rapidamente allo stadio terminale della malattia renale, mentre i pazienti che ottengono la remissione completa hanno una prognosi estremamente favorevole con un tasso di sopravvivenza renale nei successivi 10 anni superiore all'80%. Nonostante il grado di proteinuria sia considerato un buon indicatore dello stato di avanzamento della malattia nei pazienti con FSGS, ad oggi mancano bio-marcatori plasmatici che possano essere d'aiuto ai clinici nella valutazione dell'attività della malattia.

I microRNA (miRNA), RNA non codificanti di circa 22 nucleotidi di lunghezza, giocano un ruolo importante in vari processi fisiologici e patologici attraverso il silenziamento genico post-trascrizionale. Recentemente, alcuni miRNA sono stati implicati nello sviluppo di FSGS. Gebeshuber e colleghi, nel 2013, hanno riportato che la FSGS potrebbe essere indotta dal miR-193a attraverso la down-regolazione del gene *WT1* (tumore di Wilms 1). Inoltre gli autori di questo studio, hanno recentemente dimostrato che il miR-30 protegge i podociti inibendo l'attivazione dei *pathway* di Notch 1 o p53.

I miRNA sono stati identificati anche nei fluidi biologici, in particolare nel plasma e nel siero; questi miRNA circolanti possono entrare nelle cellule riceventi e regolarne l'espressione genica. Diversi studi hanno suggerito che i miRNA circolanti rappresentano bio-marcatori molto interessanti per la diagnosi di diverse malattie. Alterati livelli dei miRNA circolanti sono stati evidenziati anche in pazienti con malattie renali, tra cui insufficienza renale acuta e nefrite lupica. Tuttavia, ad oggi, non sono stati condotti studi sui livelli dei miRNA circolanti correlati all'attività della malattia di FSGS.

In questo lavoro, gli autori hanno quantificato i miRNA plasmatici in pazienti affetti da FSGS con proteinuria nefrosica mediante array ed hanno validato i risultati con real-time PCR (qRT-PCR), al fine di individuare i miRNA plasmatici associati alla FSGS che potrebbero essere utilizzati come bio-marcatori di attività della malattia.

Tutti i pazienti e i controlli sani sono stati reclutati presso il National Clinical Research Center of Kidney Diseases of Jinling Hospital (Nanjing, China) da gennaio 2011 a ottobre 2013. Sono stati arruolati 78 pazienti con FSGS con proteinuria in range nefrosico, 35 pazienti con FSGS in remissione completa, 63 pazienti con nefropatia membranosa (MN: 32 con proteinuria nefrosica e 31 in remissione completa), 59 pazienti con nefropatia diabetica (DN: 32 con proteinuria nefrosica e 27 con microalbuminuria), e 69 volontari sani abbinati per età e sesso (controlli). Sono stati inoltre raccolti i campioni di plasma da ulteriori 51 pazienti con FSGS con proteinuria in range nefrosico prima e dopo il trattamento steroideo.

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di plasma utilizzando TRIzol Reagent (Invitrogen) secondo protocollo e il profilo di espressione dei miRNA è stato valutato mediante tecnologia TaqMan® per analisi con array a bassa densità (Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0) che consente di analizzare 754 miRNA diversi.

Inizialmente sono stati valutati i livelli di espressione dei miRNA circolanti mediante array di 9 pazienti con FSGS con proteinuria nefrosica e 9 controlli al fine di identificare, in particolare, i miRNA con livelli di espressione significativamente più alti presenti nel plasma dei pazienti rispetto ai controlli (fase iniziale di screening). Successivamente i dati sono stati confermati mediante l'utilizzo di sonde TaqMan, in 32 pazienti con FSGS con proteinuria nefrosica e 30 controlli (fase di conferma). Nello step successivo, i risultati sono stati validati in altri 37 pazienti con FSGS con proteinuria nefrosica e 35 in remissione completa, per determinare una possibile riduzione di questi miRNA in fase di remissione completa (fase di validazione). Infine, i livelli plasmatici di questi miRNA sono stati esaminati ulteriormente in una coorte prospettica di 51

pazienti con FSGS con proteinuria nefrosica prima e dopo trattamento con prednisone orale, con una dose giornaliera di 1 mg/kg (massimo 60 mg) come trattamento iniziale per un periodo di almeno 8 settimane. I livelli plasmatici di miRNA sono stati esaminati, inoltre, nei pazienti con MN e con DN per determinare se l'aumento dei livelli plasmatici di miRNA fosse specifico per FSGS.

Gli autori nello studio mediante array hanno evidenziato aumentati livelli di miR-125b, miR-186 e miR-193a-3p in un pool di campioni di plasma di 9 pazienti con FSGS rispetto a quello di 9 controlli ed hanno confermato questi dati in una seconda coorte di 32 pazienti affetti da FSGS e 30 controlli attraverso qRT-PCR. Per confermare che la quantificazione dei livelli dei miR-125b, miR-186 e miR-193a-3p potrebbe essere utile ai fini della valutazione dell'attività della malattia, è stata condotta un'analisi delle curve ROC che rappresenta l'andamento dei falsi positivi in funzione dei veri positivi. L'area delimitata dalla curva ROC calcolata per il miR-125b, miR-186, miR-193a-3p e per i 3 miRNA in combinazione è risultata rispettivamente 0.882, 0.789, 0.910 e 0.963, indicando che i livelli di questi 3 miRNA consentono di distinguere i pazienti affetti da FSGS dai controlli sani.

I livelli di espressione dei miR-125b e miR-186 sono risultati significativamente più bassi nei pazienti con FSGS in remissione completa (n=35) rispetto ai pazienti con proteinuria nefrosica (n=37). Nello studio prospettico, i livelli dei miR-125b e miR-186 sono risultati, dopo il trattamento con steroidi, notevolmente ridotti nei pazienti con FSGS in remissione completa (n=29), ma non nei pazienti con malattia attiva non responsivi al trattamento (n=22). Al contrario, nei pazienti con nefropatia membranosa (n=63) e nefropatia diabetica (n=59), i livelli plasmatici del miR-125b e del miR-186 non variavano rispetto ai controlli sani, indipendentemente dal grado di proteinuria. Infine, gli autori hanno evidenziato che i livelli plasmatici del miR-186, ma non del miR-125b, erano correlati con il grado di proteinuria nei pazienti con FSGS (n=151).

Gli autori sono consapevoli di alcune limitazioni di questo studio e sottolineano come l'eterogeneità della FSGS richieda la necessità di validare questi risultati in coorti di pazienti più grandi e con etnie diverse.

In conclusione questo studio suggerisce che, l'identificazione di miRNA circolanti differenzialmente espressi nei pazienti con FSGS, in particolar modo di miRNA-186, potrebbe fornire un valido metodo per diagnosticare e monitorare la FSGS. Conoscere i geni target dei miR-125b e miR-186, così come i meccanismi molecolari attraverso i quali i livelli plasmatici dei miRNAs sono collegati all'attività di malattia della FSGS, potrebbero aiutare a comprendere meglio la patogenesi di questa malattia ed ampliare le applicazioni cliniche di questi miRNAs.

**Parole chiave:** microRNA circolanti, focal segmental glomerulosclerosis, proteinuria, remissione, profilo di espressione

#### Riferimento bibliografico

[Zhang C](#) et al. *Am J Kidney Dis* 2015, 65(2):223-32.

---

## UNO STUDIO DI FARMACOGENETICA IMPLICA *SLC9A9* NELL'ATTIVITÀ DI MALATTIA NELLA SCLEROSI MULTIPLA

A cura della Dott.ssa Claudia Pisanu

La risposta al trattamento nei pazienti affetti da sclerosi multipla (SM) è altamente eterogenea. L'interferone (IFN) beta è un farmaco di prima linea in grado di modificare il corso di malattia (DMT) nella sclerosi multipla recidivante-remittente (SMRR), che si è dimostrato in grado di ridurre l'attività di malattia clinica e radiologica. Tuttavia, la percentuale di pazienti che non risponde è compresa tra il 10 e il 50%, a seconda della definizione di risposta che viene applicata. Un approccio terapeutico personalizzato sarebbe essenziale per ridurre il più possibile l'attività di malattia nei pazienti con SM. Gli autori dello studio hanno utilizzato un approccio *genome-wide* allo scopo di individuare biomarker e aumentare la conoscenza della patofisiologia dell'attività di malattia nella SM.

La prima parte dello studio è consistita in un *genome wide association study* (GWAS) e successiva replicazione su coorti indipendenti di pazienti con SM. La coorte di *discovery* comprendeva 146 pazienti

reclutati presso l'ospedale San Raffaele di Milano e originariamente inseriti nel progetto Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). La diagnosi per tutti i pazienti rispondeva ai criteri di McDonald. Nello stesso ospedale sono stati reclutati anche i pazienti per la fase di replicazione ( $n = 275$ ) e per la valutazione dell'effetto delle varianti genetiche sulla risposta al glatiramer acetato (GA) ( $n = 157$ ). Lo studio comprendeva anche due ulteriori coorti di replicazione: 557 pazienti con SM reclutati al Brigham and Women's Hospital di Boston e 325 pazienti reclutati presso 7 ospedali universitari in Francia. Per tutti i pazienti, i criteri di inclusione prevedevano diagnosi di SMRR, prima DMT con IFN beta o GA per almeno 6 mesi e almeno 2 anni di follow-up.

In base a criteri clinici e radiologici, i pazienti italiani sono stati identificati come *responder*, *non responder* e *partial responder* alla terapia (*responder*: nessuna recidiva e assenza di nuove lesioni T2 o captanti gadolinio nei due anni di follow-up; *non responder*: riduzione  $<50\%$  del tasso di recidiva annuo rispetto ai due anni precedenti il trattamento, o  $> 2$  lesioni T2 o captanti gadolinio alla fine del primo anno di follow-up, o  $>4$  lesioni T2 o captanti gadolinio alla fine del secondo anno di follow-up; *partial responder*: pazienti che non soddisfacevano i criteri delle altre due categorie). Non essendo disponibile per le coorti americane e francesi il dato relativo al numero di recidive nei due anni precedenti l'inizio del trattamento, sulle coorti di replicazione non è stata applicata la distinzione tra *partial* e *non responder*. Inoltre, non essendo disponibili dati di Magnetic Resonance Imaging (MRI) per la maggior parte dei pazienti della coorte francese, la definizione di risposta si è basata sull'attività clinica. I risultati delle replicazioni sui campioni indipendenti sono stati analizzati tramite meta-analisi utilizzando un approccio fixed-effect.

La seconda fase dello studio è consistita in un'analisi di cis expression quantitative trait loci (eQTL) utilizzando dati generati tramite il progetto ImmVar da monociti CD14<sup>+</sup> e cellule T CD4<sup>+</sup> di soggetti sani, e i dati di espressione ex vivo ottenuti da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di soggetti affetti da malattia demielinizzante (SM o sindrome clinicamente isolata) non trattati, trattati con IFN beta o GA e reclutati presso l'ospedale Brigham.

Nella coorte di *discovery*, 74 pazienti sono stati classificati come *responder* e 42 come *non responder*. Dopo il controllo di qualità, 539.016 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono stati valutati per l'associazione con la risposta all'IFN beta e solo uno SNP ha superato la soglia di significatività *genome-wide*: l'allele G dello SNP rs9828519 è risultato associato con un aumentato rischio di scarsa risposta all'IFN beta ( $p = 4.43 \times 10^{-8}$ , OR = 5.46). La proporzione di *non responder* è risultata aumentare per ogni copia aggiuntiva dell'allele G, suggerendo un effetto additivo. Rs9828519 è uno SNP intronico localizzato nel gene *SLC9A9* sul cromosoma 3q24. I risultati della replicazione sui 3 data set hanno confermato l'associazione di rs9828519 con un aumentato rischio di mancata risposta all'IFN beta ( $p = 7.78 \times 10^{-04}$ , OR = 1.48). In tutte e tre le coorti l'allele G è stato associato a una peggiore risposta al trattamento. Per valutare se l'allele G dello SNP rs9828519 fosse associato a un'aumentata attività di malattia a prescindere dal trattamento, gli autori hanno valutato la sua associazione con la risposta al GA in un campione di pazienti con MS italiani e americani ( $n = 157$  e 189, rispettivamente). Nel dataset italiano, al posto di rs9828519 (non disponibile nel chip Illumina 2.5) è stato utilizzato uno SNP in perfetto *linkage disequilibrium*, rs2800. Una meta-analisi dei risultati dei due dataset ha mostrato assenza di associazione tra la variante e la risposta al trattamento con GA.

Gli esperimenti di eQTL condotti dagli autori hanno suggerito che rs9828519 non sia in grado di modificare l'espressione del gene *SLC9A9*. Gli autori hanno osservato un aumento dell'espressione di *SLC9A9* dopo stimolazione con IFN beta in PBMC di controlli sani ( $p = 4.01 \times 10^{-07}$ ), senza però osservare differenze tra rs9828519<sup>AA</sup> e rs9828519<sup>GG</sup>. Inoltre, i dati di due studi condotti in maniera indipendente i cui dataset sono pubblici (GSE24427 e GSE26104) mostrano una upregolazione di *SLC9A9* in pazienti con MS dopo trattamento con IFN beta. Le analisi dei livelli di espressione di *SLC9A9* nelle PBMC di soggetti affetti da malattia demielinizzante hanno mostrato una *down regulation* del gene nei pazienti classificati come a maggior rischio di recidiva (subset MS<sub>A</sub>). Inoltre, le analisi condotte sui dati del progetto ImmVar hanno mostrato una *down regulation* di *SLC9A9* durante il processo di differenziazione delle cellule T CD4<sup>+</sup> in Th1 e Th17, due subset di cellule proinfiammatorie che giocano un ruolo importante negli eventi infiammatori della SM. Per approfondire se il knockout del gene *SLC9A9* influisse sull'attivazione e differenziazione delle cellule T CD4 in Th1 e Th17, gli autori hanno utilizzato un modello in vitro. I risultati di questi esperimenti suggeriscono che il *knockdown* del gene upregoli la produzione di IFN gamma nelle cellule Th1.

*SLC9A9* codifica per un *exchanger* sodio/idrogeno ampiamente espresso (incluso a livello del sistema nervoso centrale e delle cellule del sistema immunitario), localizzato all'interno del compartimento endosomiale e coinvolto nella regolazione del pH intraluminale. Non esistono in letteratura altri studi che abbiano dimostrato un ruolo di questo gene nella SM o nel *pathway* dell'IFN beta. Tuttavia, recenti evidenze suggeriscono che i meccanismi di scambio ionico possano essere implicati nella risposta al farmaco. Gli autori dello studio speculano che l'azione del gene *SLC9A9* sul pH endosomiale e dell'apparato del Golgi potrebbe indurre alterazioni della glicosilazione, un meccanismo implicato nell'infiammazione e nella SM. Gli autori ipotizzano che in futuro si possano esplorare nuovi approcci terapeutici che abbiano come target le componenti infiammatorie della SM, ad esempio i trasportatori sodio/idrogeno.

In conclusione, lo studio suggerisce che lo SNP rs9828519 possa essere associato con la risposta all'IFN beta nei pazienti con SM e che il gene *SLC9A9* possa essere implicato nell'attività di malattia.

**Parole chiave:** interferone beta, sclerosi multipla, *SLC9A9*

#### Riferimento bibliografico

[Esposito F](#) et al. *Ann Neurol* 2015, 78:115-27.

### LA METANALISI DEL MESE

#### ASSOCIAZIONE TRA I POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE DEL GENE XRCC3 E GLI EVENTI AVVERSI INDOTTI DA RADIOTERAPIA SUL TESSUTO NORMALE: UNA META-ANALISI

A cura del Dott. Vittorio Simeon

La radioterapia svolge un ruolo molto importante nella terapia oncologica, ma solitamente oltre all'area target selezionata anche i tessuti normali circostanti vengono irradiati, comportando di conseguenza una serie di eventi avversi. Solitamente la dose prescritta di radioterapia ha come fattore limitante la tolleranza del tessuto normale alle radiazioni. Tuttavia, i pazienti esibiscono solitamente un'ampia variabilità nella tossicità del tessuto normale anche se sottoposti allo stesso regime terapeutico. Alcuni pazienti mostrano effetti di iper-sensibilità a dosi standard, mentre pazienti solitamente sensibili possono ricevere dosi più alte di radioterapia migliorando così le probabilità di guarigione. Predire a priori il rischio di eventi avversi alla radioterapia sarebbe di un enorme beneficio per la personalizzazione e l'ottimizzazione della strategia terapeutica. Negli anni recenti, numerose evidenze hanno supportato l'ipotesi che il rischio di radiotossicità possa essere correlato alla predisposizione genetica. Il DNA è comunemente considerato il target principale della radioterapia, che è in grado di causare la morte cellulare per induzione di rotture a singolo (SSBs – single-strand breaks) e doppio (DSBs – double-strand breaks) filamento. La proteina XRCC3 (x-ray repair cross-complementing group 3), membro della famiglia di RAD51, partecipa nel riparo per ricombinazione omologa dei DSBs e gioca un ruolo importante nel mantenimento della stabilità cromosomica e del riparo del danno al DNA. Sono stati condotti numerosi trial con l'ipotesi che polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dei geni coinvolti nel riparo del DNA potessero interferire con la capacità individuale di riparare il danno e di conseguenza influenzare la suscettibilità agli eventi avversi indotti dalla radioterapia. Gli studi precedenti sull'associazione dei polimorfismi di XRCC3 e gli eventi avversi indotti da radioterapia hanno portato a risultati inconcludenti. In questo studio, gli Autori hanno condotto una meta-analisi al fine di chiarire il ruolo dei polimorfismi di XRCC3 nella suscettibilità al rischio di reazione avversa indotta da radioterapia.

La ricerca dei dati è stata effettuata utilizzando i database PubMed, Embase e Web of Science con i seguenti termini "polimorfismo o SNP", "XRCC3", "radioterapia o radiazione", "danno o tossicità o evento avverso o complicazione". Gli studi presi in considerazione dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: 1)

essere studi caso-controllo o di coorte; 2) valutare l'effetto degli SNP di XRCC3 sugli eventi avversi indotti da radiazione sul tessuto normale; 3) possedere informazioni adeguate per calcolare gli odds ratio (OR) e il corrispondente intervallo di confidenza (95% CI). Sono stati calcolati gli OR aggregati dei vari studi prendendo in analisi l'associazione genetica utilizzando unicamente il modello dominante (omozigote allele recessivo/eterozigote vs omozigote allele dominante). L'eterogeneità tra gli studi è stata calcolata utilizzando il Q test chi quadrato e la statistica  $I^2$ . Quando il p-value di questo test era  $<0.10$  e la  $I^2 >50\%$ , l'eterogeneità è stata considerata statisticamente significativa ed è stato utilizzato il modello ad effetti casuali in sostituzione del modello ad effetti fissi, utilizzato quest'ultimo in assenza di eterogeneità.

Sono stati inclusi in questa meta-analisi 17 studi con un totale di 2849 pazienti. Il numero dei pazienti compresi nei singoli studi varia da un minimo di 34 ad un massimo di 698. Gli studi in analisi prendevano in considerazione diverse patologie oncologiche: tumori della testa e del collo (cinque studi), carcinoma della mammella (cinque studi), carcinoma della prostata (due studi), tumore del polmone non a piccole cellule (due studi), tumore della vescica (uno studio) e tumore ginecologico (uno studio). Sono stati inclusi nella meta-analisi tre polimorfismi di XRCC3: rs861539 (quindici studi), rs1799794 (cinque studi) e rs1799796 (due studi). Per il polimorfismo rs861539, in sei studi sono stati valutati gli eventi avversi a breve termine indotti da radioterapia, mentre in nove studi sono stati valutati gli eventi avversi a lungo termine.

Lo studio ha messo in evidenza un'associazione statisticamente significativa del polimorfismo rs861539 e gli eventi avversi a breve termine indotti da radioterapia (OR=1.99, 95% CI: 1.31 – 3.01,  $P = 0.001$ ). È stata successivamente condotta un'analisi di sottogruppo sul tipo di evento avverso e il polimorfismo rs861539 è stato associato a tossicità cutanea (OR=1.86, 95% CI: 1.13 – 3.05,  $P = 0.01$ ) e mucosite orale (OR=2.89, 95% CI: 1.24 – 6.76,  $P = 0.01$ ). Per i polimorfismi rs1799794 e 1799796 il numero degli studi identificati è relativamente basso e l'associazione con gli eventi avversi a breve termine non è statisticamente significativa. Un'associazione positiva ma non significativa è stata identificata per il polimorfismo rs861539 e gli eventi avversi a lungo termine. Dopo analisi di sottogruppo, la fibrosi è risultato l'unico evento avverso ad essere associato significativamente (OR=1.95, 95% CI: 1.01 – 3.75,  $P = 0.05$ ). Per il polimorfismo rs1799794 è stata identificata un'associazione significativa con gli eventi avversi a lungo termine (OR=0.47, 95% CI: 0.26 – 0.86,  $P = 0.01$ ). È stata infine condotta un'analisi per differenti aree di irradiazione senza considerare il tipo di evento avverso (a breve o a lungo termine). L'analisi è stata effettuata per il polimorfismo rs861539, l'unico con un numero di studi sufficiente, e sia l'irradiazione dell'area testa collo (OR=2.41, 95% CI: 1.49 – 3.89,  $P 0.0003$ ) che della mammella (OR=1.41, 95% CI: 1.02 – 1.95,  $P 0.04$ ) mostravano un'associazione con gli eventi avversi indotti da radioterapia.

Gli eventi avversi da radioterapia sono comunemente classificati come effetti a breve o a lungo termine, a seconda del tempo di insorgenza dei sintomi clinici. Gli effetti a breve termine si manifestano comunemente durante la radioterapia o nell'arco di poche settimane, mentre gli effetti a lungo termine si manifestano mesi o anni dopo la radioterapia. Nel presente studio, è stata condotta per la prima volta una revisione sistematica e meta-analisi degli studi riguardanti l'associazione dei polimorfismi di XRCC3 con l'insorgere di eventi avversi su tessuto normale in seguito a radioterapia. I risultati indicano una forte associazione del polimorfismo rs861539 (p.Thr241Met) con il rischio di eventi avversi a breve termine in seguito a radioterapia. Il polimorfismo rs1799794 ha invece mostrato un'associazione significativa con gli eventi avversi a lungo termine ma con un OR che indica un ruolo protettivo verso questo tipo di evento. Tuttavia occorre sottolineare che gli studi inclusi nella meta-analisi di rs1799794 sono solo due, e quindi occorre prendere questo dato con una certa cautela. Un altro possibile fattore limitante di questo studio è la presenza di eterogeneità, in parte dovuta, probabilmente, ai differenti protocolli radioterapici utilizzati. Ulteriori studi prospettici e con ampie casistiche sono pertanto necessari al fine di confermare i risultati di questa meta-analisi e validare il ruolo dei polimorfismi del gene XRCC3 come fattori predittivi dell'insorgenza di eventi avversi indotti da radioterapia.

Il polimorfismo rs861539 (p.Thr241Met) del gene XRCC3 è associato al rischio di eventi avversi a breve termine in seguito a radioterapia (OR=1.99, 95% CI: 1.31 – 3.01,  $P = 0.001$ ), in particolare con il rischio di tossicità cutanea (OR=1.86, 95% CI: 1.13 – 3.05,  $P = 0.01$ ) e di mucositi orali (OR=2.89, 95% CI: 1.24 – 6.76,  $P = 0.01$ ).

**Parole chiave:** XRCC3, radioterapia, eventi avversi a breve termine, eventi avversi a lungo termine

**Riferimento bibliografico**

[Song YZ](#) et al. *PLoS One* 2015, 10(6):e0130388

*La newsletter di SIF-Farmacogenetica va in ferie.  
Auguri di buone vacanze a tutti i nostri lettori.  
Arrivederci a settembre.*

*La redazione*

**Sostieni la Società Italiana di Farmacologia**

La Società Italiana di Farmacologia è tra i beneficiari dei proventi del 5 per mille dell'IRPEF.

È sufficiente apporre la propria firma ed indicare, sulla dichiarazione dei redditi, nel riquadro associazioni di volontariato, onlus, associazioni di promozione sociale e da altre fondazioni e associazioni riconosciute, il Codice Fiscale della SIF che è 97053420150, per destinare tali fondi a Borse di studio SIF per giovani ricercatori.

Per maggiori informazioni, contattare la segreteria SIF: tel. 02-29520311.

[sif.informazione@segr.it](mailto:sif.informazione@segr.it); [sif.farmacologia@segr.it](mailto:sif.farmacologia@segr.it).

**SIF – FARMACOGENETICA****Newsletter del Gruppo di lavoro sulla Farmacogenetica della Società Italiana di Farmacologia**

Registrazione del Tribunale di Milano n° 180 data 31/03/2010 - ISSN 2282-4758

[http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif\\_gruppo\\_farmacogen.php](http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php)

Direttore	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano)
Vice-Direttore	Prof. Diego Fornasari (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Caporedattori	Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargin (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna) Dott.ssa Stefania Cheli (AO Polo Universitario "L. Sacco" di Milano) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Eva Cuzzoni (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Marianna Lucafò (Università di Trieste) Dott.ssa Valentina Manzo (Università di Salerno) Dott.ssa Claudia Pisanu (Università di Cagliari) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Giulia Sammarini (Università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB)



**Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF**

<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/pagina/archivio>

Contatti: [webmaster@sifweb.org](mailto:webmaster@sifweb.org)

---

**DISCLAIMER – Leggere attentamente**

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet [www.sifweb.org](http://www.sifweb.org) informazioni precise ed aggiornate, ma non si assume alcuna responsabilità né garantisce la completezza ed esaustività delle informazioni messe a disposizione. In particolare, SIF precisa che le risposte fornite ai quesiti medico / tossicologici sono fornite sulla base della raccolta di fonti bibliografiche esistenti (rispetto alle quali non si garantisce la esaustività). Pertanto, dalle risposte ai quesiti non devono essere tratte conclusioni se non un mero richiamo alle fonti presenti in letteratura. La SIF, inoltre, avvisa gli utenti che le informazioni contenute nel proprio sito e le risposte ai quesiti hanno finalità meramente divulgative, informative ed educative e non possono in alcun modo sostituire la necessità di consultare il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità e più in generale le Istituzioni nazionali ed internazionali attive in materia. **IL SITO INTERNET DI SIF E LE RISPOSTE AI QUESITI NON DEVONO IN ALCUN MODO ESSERE CONSIDERATI PARERI MEDICI.** SIF, quindi, declina ogni responsabilità circa l'utilizzo del proprio sito, delle informazioni in esso contenute e delle risposte ai quesiti ed avverte l'utente che ogni e qualsiasi contenuto ed informazione del sito (comprese le risposte ai quesiti) sarà utilizzata sotto diretta e totale responsabilità dell'utente stesso. Né SIF, né alcuna altra parte implicata nella creazione, realizzazione e pubblicazione del sito internet di SIF e nelle redazioni delle risposte ai quesiti possono essere ritenute responsabili in alcun modo, né per alcun danno diretto, incidentale, conseguente o indiretto che deriva dall'accesso, uso o mancato uso di questo sito o di ogni altro ad esso collegato, o di qualunque errore od omissione nel loro contenuto. Le informazioni fornite nelle newsletters, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su <http://www.sifweb.org>, sulle relative newsletters, e-mails, o qualsiasi dei progetti della SIF, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. La Società Italiana di Farmacologia, i suoi Soci ed altre parti ed essa connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione di "SIF-Farmacogenetica" senza precedente autorizzazione scritta della Società Italiana di Farmacologia.

---

**RICEZIONE NEWSLETTER**

Nella consapevolezza che le e-mail indesiderate sono oggetto di disturbo, vi informiamo che il vostro indirizzo viene conservato e trattato nel rispetto del DL 196/03 ed in qualsiasi momento potrà esserne richiesta la modifica o cancellazione come previsto dall'articolo 13. Tutti i destinatari della e-mail sono in copia nascosta (Privacy L. 75/96).

Qualora non intendeste ricevere ulteriori comunicazioni vi preghiamo di inviare una risposta all'indirizzo [sif.farmacologia@segr.it](mailto:sif.farmacologia@segr.it) con oggetto: CANCELLA.

---

---